

09/920 435
09-07-04

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Dezember 2001 (13.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/94943 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/53**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE01/02086**

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Juni 2001 (06.06.2001)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
100 28 186.9 9. Juni 2000 (09.06.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN (DE/DE); Ulrich-Schalk-Strasse 3 a, 91056 Erlangen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WANNER, Klaus (DE/DE); Kreiller Strasse 122, 81825 München (DE). HÖFNER, Georg (DE/DE); Am Olivberg 44, 83607 Holzkirchen (DE). BERTLING, Wolf (DE/DE); Meisenweg 22, 91056 Erlangen (DE).

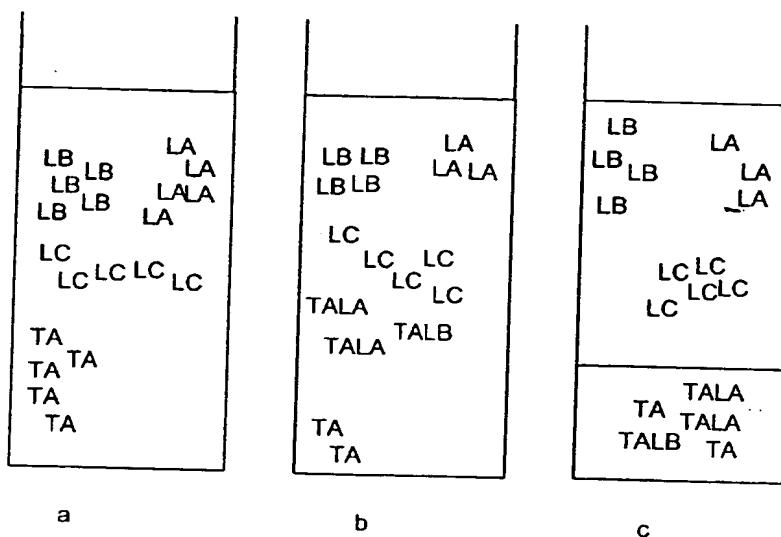
(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49 A, 91052 Erlangen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE QUANTITY OF LIGANDS THAT ARE BOUND TO TARGET MOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER MENGE VON AN ZIEL-MOLEKÜLEN GEBUNDENEN LIGANDEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for determining the quantity of ligands that are bound to target molecules. Said method comprises the following steps: a) Preparing the target molecules and a mixed phase containing a predetermined quantity of ligands in native form, b) Bringing the mixed phase into contact with the target molecules and incubating said phase, c) Separating the quantity of unbound ligands from the mixed phase under conditions, in which the quantity of unbound ligands remains constant, d) Determining the quantity of bound ligands in the mixed phase and e) Determining the quantity of bound ligands, by calculating the difference between the quantity of ligands as per step a) and the quantity of ligands determined as per step d), whereby the mixed phase as per step a) contains different ligands which act in part as a reference.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/94943 A2



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Menge von an Ziel-Molekülen gebundenen Liganden mit folgenden Schritten: a) Bereitstellen der Ziel-Moleküle und einer die Liganden in nativer Form in einer vorgegebenen Menge enthaltenden Mischphase, b) Inkontaktbringen und Inkubieren der Mischphase mit den Ziel-Molekülen, c) Absondern gebundener Liganden von der Mischphase unter Bedingungen, unter denen die Menge ungebundener Liganden konstant bleibt, d) Ermitteln der Menge ungebundener Liganden in der Mischphase und e) Ermitteln der Menge gebundener Liganden durch Differenzbildung zwischen der Menge der Liganden gemäß lit. a und der gemäß lit. d ermittelten Menge der Liganden, wobei die Mischphase gemäß Schritt lit. a verschiedene Liganden enthält, die teilweise als Referenz dienen.

Verfahren zur Bestimmung der Menge von an Ziel-Molekülen gebundenen Liganden

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Menge von an Ziel-Molekülen gebundenen Liganden sowie eine Kombination von Liganden zur Verwendung in einem erfindungsgemäßen Verfahren.

In der US 5,891,742 A werden Verfahren zum schnellen und einfachen Auffinden von Liganden aus einer Mischung von Testsubstanzen beschrieben. Dabei wird diese Mischung mit einer Zielstruktur inkubiert. Die Zielstruktur kann sowohl in Lösung als auch immobilisiert vorliegen. Nach der Inkubation werden die Zielstrukturen mit gebundenen Testsubstanzen abgetrennt. Die gebundenen Testsubstanzen werden direkt massenspektrometrisch analysiert und identifiziert.

Die üblichen Verfahren zur Bestimmung der Menge von an Ziel-Molekülen gebundenen Liganden umfassen folgende Schritte:

- a) Bereitstellen von Ziel-Molekülen und einer Lösung von mit einer Markierungssubstanz versehenen Liganden,
- b) Inkontaktbringen und Inkubieren der Lösung mit den Ziel-Molekülen,
- c) Trennen der an Ziel-Moleküle gebundenen von nicht gebundenen Liganden,
- d) ggf. Waschen der abgetrennten an Ziel-Moleküle gebundenen Liganden und

- e) Quantifizieren gebundener Liganden durch Messen der Menge der Markierungssubstanz der gebundenen Liganden.

Die Markierungssubstanz kann beispielsweise ein Fluorophor, 5 eine radioaktive Verbindung oder ein Enzym sein. Die Markierungssubstanzen verändern häufig die Bindungseigenschaften der Liganden. Dann ist es bei der hier beschriebenen direkten Quantifizierung nicht möglich, exakt die Menge nativer Liganden zu bestimmen, welche unter den gleichen Bedingungen binden würden. 10

Bei einer indirekten Quantifizierung enthält die Lösung beim Schritt lit. a zusätzlich native Liganden. Die mit einer Markierungssubstanz versehenen Liganden weisen eine definierte 15 Affinität und Selektivität zu den Ziel-Molekülen auf. Beim Schritt lit. b konkurrieren sie mit den nativen Liganden um die Bindung an den Ziel-Molekülen. Die Menge der gebundenen nativen Liganden wird durch Quantifizieren der gebundenen mit einer Markierungssubstanz versehenen Liganden indirekt ermittelt. 20 Werden Liganden eingesetzt, die durch ihre Masse eindeutig identifizierbar sind, können gebundene Liganden massenspektrometrisch quantifiziert werden. Es ist nicht erforderlich markierte Liganden einzusetzen.

Schritt lit. b erlaubt das Binden der Liganden an die Ziel-Moleküle. Dabei bilden sich Liganden-Ziel-Molekül-Komplexe. Das Trennen gebundener von nicht gebundenen Liganden kann beispielsweise mittels Filtration oder Größenausschlußchromatographie erfolgen. Es können auch an einem Träger immobilisierte Ziel-Moleküle bereitgestellt werden. In diesem Fall 25 sondern sich die Liganden beim Binden von der Lösung ab. Falls der Träger, wie beispielsweise Mikrokügelchen, in Suspension vorliegt, kann dieser durch Zentrifugation abgeson-

dert werden. Nach dem Entfernen der Lösung haften an den gebildeten Liganden-Ziel-Molekül-Komplexen noch ungebundene Liganden. Diese werden durch Waschen entfernt.

- 5 Sämtliche Trennverfahren einschließlich des Waschens haben das Ziel, ungebundene Liganden möglichst vollständig von gebildeten Liganden-Ziel-Molekül-Komplexen zu trennen. Die Menge der in den abgetrennten Liganden-Ziel-Molekül-Komplexen vorhandenen Liganden wird, insbesondere durch Quantifizieren 10 der Markierungssubstanz, ermittelt. Die ermittelte Menge gebundener Liganden wird der Liganden-Menge gleichgesetzt, welche ursprünglich im Bindungsgleichgewicht an die Ziel-Moleküle gebunden war. Die Menge der nach einer unvollständigen Trennung an den Liganden-Ziel-Molekül-Komplexen noch anhaftenden ungebundenen Liganden würde die Quantifizierung gebundener Liganden verfälschen.

Die genannten Verfahren zur Quantifizierung gebundener Liganden weisen einen systemimmannten Fehler auf: Die Abtrennung 20 der gebundenen von den nicht gebundenen Liganden einschließlich des Waschens führt zu einer Aufhebung des Bindungsgleichgewichts. Das bewirkt eine Verringerung der Anzahl gebildeter Liganden-Ziel-Molekül-Komplexe. Diese beginnen zu dissoziieren, sobald sich die Liganden-Konzentration in der 25 die Liganden-Ziel-Molekül-Komplexe umgebenden Lösung verringert. Die beim Schritt lit. e ermittelte Menge gebundener Liganden ist nicht identisch mit der Menge der ursprünglich gebundenen Liganden.

- 30 Die DE 198 14 775 A1 offenbart ein Verfahren zur Bestimmung der Bindungskonstanten gelöster Stoffe und Substanzen an Oberflächen aus amphiphilen Molekülen. Dabei werden Schichten amphiphiler Moleküle an einen festen Träger gebunden, so daß

sich eine festkörperunterstützte Membran ausbildet. Eine definierte Menge dieser festkörperunterstützten Membran wird mit einer mobilen Phase in Kontakt gebracht. Die mobile Phase enthält eine definierte Menge von auf Lipidbindung zu untersuchenden Substanzen. Nach einer Inkubation werden die festkörperunterstützten Membranen von der mobilen Phase abgetrennt. Die Konzentrationen der Substanzen in der mobilen Phase oder der festkörperunterstützten Membran werden ermittelt. Das Verfahren kann mit in unterschiedlichen Mengenverhältnissen vorliegenden festkörperunterstützten Membranen und Substanzen durchgeführt werden. Aus den dabei ermittelten Konzentrationen kann die Bindungskonstante berechnet werden.

Bei den im Stand der Technik bekannten Verfahren ist es erforderlich, entweder die gebundenen oder nicht gebundenen Liganden direkt oder indirekt zu quantifizieren. Beim direkten Quantifizieren kann das je nach Ligand mit einem erheblichen Aufwand verbunden sein. Zur Quantifizierung muß das jeweils verwendete Detektionssystem für jeden zu quantifizierenden Liganden kalibriert werden. Das ist auch für Liganden erforderlich, von denen nicht bekannt ist, ob sie eine Affinität zu den Ziel-Molekülen aufweisen. Auch das indirekte Quantifizieren mittels markierter Liganden ist aufwendig. Es ist zunächst erforderlich, die Liganden mit einer Markierungssubstanz so zu markieren, daß die markierten Liganden noch eine ausreichende Affinität zu den Ziel-Molekülen aufweisen. Häufig müssen dazu verschiedene Markierungsmethoden mit verschiedenen Markierungssubstanzen erprobt werden. Oftmals erweisen sich nur radioaktive Markierungssubstanzen als geeignet. Das Handhaben dieser Markierungssubstanzen und der damit markierten Liganden ist gefährlich und wegen der erforderlichen Sicherheitsvorkehrungen aufwendig. Weiterhin ist nicht jeder Ligand dazu geeignet, mit einer bestimmten gewünschten

Methode markiert zu werden. Dadurch kann eine Suche nach geeigneten Liganden erforderlich sein.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile des Stands der Technik zu beseitigen. Insbesondere soll ein Verfahren bereitgestellt werden, das es ermöglicht, die Menge von an Ziel-Molekülen gebundenen Liganden zu ermitteln.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 23 und 25 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 - 22 und 24.

Erfindungsgemäß ist ein Verfahren zur Bestimmung der Menge von an Ziel-Molekülen gebundenen Liganden mit folgenden Schritten vorgesehen:

- a) Bereitstellen der Ziel-Moleküle und einer die Liganden in nativer Form in einer vorgegebenen Menge enthaltenden Mischphase,
- b) Inkontaktbringen und Inkubieren der Mischphase mit den Ziel-Molekülen,
- c) Absondern gebundener Liganden von der Mischphase unter Bedingungen, unter denen die Menge ungebundener Liganden konstant bleibt,
- d) Ermitteln der Menge ungebundener Liganden in der Mischphase und
- e) Ermitteln der Menge gebundener Liganden durch Differenzbildung zwischen der Menge der Liganden gemäß lit. a und der gemäß lit. d ermittelten Menge der Liganden,

wobei die Mischphase gemäß Schritt lit. a verschiedene Liganden enthält, die teilweise als Referenz dienen.

Unter der Bestimmung bzw. dem Ermitteln einer Menge wird auch
5 eine bloße Abschätzung der Menge verstanden. Es versteht sich, daß statt einer Menge auch eine Konzentration bestimmt bzw. ermittelt bzw. abgeschätzt werden kann. Wird nur eine Art von Ziel-Molekülen mit einheitlichen Bindungsstellen bereitgestellt und ist die Zahl der Bindungsstellen bekannt,
10 kann aus den gemäß lit. d und lit. e ermittelten Mengen auch die Affinität der Liganden zu den Bindungsstellen errechnet werden. Das Verfahren ermöglicht es, die Mengen verschiedener an Ziel-Moleküle gebundener Liganden gleichzeitig zu bestimmen. Der Begriff Mischphase umfaßt sowohl eine reine Lösung
15 als auch eine Suspension. Die Mischphase kann Membranstrukturen, wie z.B. Vesikel, enthalten. Die Ziel-Moleküle können in Lösung, in Suspension oder immobilisiert vorliegen. Immobilisierte Ziel-Moleküle können z.B. an einer Wand eines die Mischphase mit den Liganden enthaltenden Gefäßes oder an Partikeln immobilisiert sein. Zur Durchführung des Schritts lit.
20 c ist jedes beliebige Verfahren geeignet, bei dem das Absondern gebundener Liganden unter Bindungsbedingungen erfolgt. Dabei ändert sich die Konzentration der ungebundenen Liganden in der die Liganden-Ziel-Molekül-Komplexe kontaktierenden
25 Mischphase nicht. Die Menge der gebildeten Liganden-Ziel-Molekül-Komplexe bleibt konstant. Als ein solches Verfahren kommt z.B. ein Absondern gebildeter Liganden-Ziel-Molekül-Komplexe mittels Zentrifugieren in Betracht. Danach kann die Liganden-Konzentration und/oder -Menge in der Mischphase ermittelt werden, welche das beim Zentrifugieren gebildete Pellet überschichtet. Das Absondern gebundener Liganden umfaßt
30 auch das durch das Binden an immobilisierte Ziel-Moleküle

stattfindende Absondern von Liganden aus der Mischphase. Zum Ermitteln der Liganden-Konzentration und/oder -Menge ist beispielsweise die Massenspektrometrie geeignet.

5 "Native Form" bedeutet, daß die Liganden keine für den Nachweis, die Quantifizierung oder die Identifizierung erforderlichen Modifikationen aufweisen. Solche Modifikationen können bspw. in einer Markierung mit einem Markierungsstoff bestehen.

10 Unter einer Referenz wird allgemein eine vorbekannte Substanz mit bekannten Eigenschaften verstanden, die Informationen über eine andere Substanz oder ein bestimmtes System bereitstellen kann. Die Referenz kann z.B. Werte liefern, welche 15 als Bezugsgrößen für unbekannte Werte dienen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren dienen vorbekannte quantifizierbare Liganden als Referenz. Sie binden beim Schritt 20 lit. b an die Ziel-Moleküle. Sie können bspw. dazu dienen, den Anteil unspezifisch bindender Liganden zu bestimmen. Die Bindung der als Referenz dienenden Liganden an die Ziel-Moleküle kann aber auch durch die Bindung anderer in der Mischphase enthaltener Liganden an die Ziel-Moleküle inhibiert werden. Das kann z.B. durch eine allosterische Inhibition der Bindung oder dadurch erfolgen, daß die Referenz und die Liganden um die Bindung an eine Bindungsstelle der Liganden an den Ziel-Molekülen konkurrieren. Die Menge der gebundenen als Referenz dienenden Liganden kann das Ermitteln der 25 Menge der anderen gebundenen Liganden ermöglichen.

30 Beispielsweise kann ein Ligand mit mittlerer Affinität zu den Ziel-Molekülen als Referenz dienen, von welchem beim Schritt lit. b etwa die Hälfte der in der Mischphase enthaltenen Men-

ge an die Ziel-Moleküle binden würde, wenn sonst keine dessen Bindung inhibierenden Liganden in der Mischphase enthalten wären. Aus der beim Schritt lit. e ermittelten Menge der als Referenz dienenden gebundenen Liganden kann dann die Menge 5 der an die Ziel-Moleküle gebundenen anderen Liganden bestimmt oder zumindest abgeschätzt werden. Die als Referenz dienenden Liganden sind bevorzugt so ausgewählt, daß sie sich bei einem beim Schritt lit. d zum Ermitteln der Menge gewählten Verfahren mit hoher Empfindlichkeit nachweisen lassen.

10

Weiterhin können die als Referenz dienenden Liganden eine selektive Affinität zu bestimmten Ziel-Molekülen aufweisen. Dadurch kann bei verschiedenen Ziel-Molekülen das Ermitteln der Menge von an die bestimmten Ziel-Moleküle gebundenen anderen 15 Liganden selektiv ermöglicht werden. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß sich eine unspezifische Bindung der nicht als Referenz dienenden anderen Liganden kaum auf die Menge der gebundenen als Referenz dienenden Liganden auswirkt. Eine mittels der als Referenz dienenden Liganden ermittelte Menge der spezifisch gebundenen anderen Liganden 20 wird nur unwesentlich durch die unspezifische Bindung der anderen Liganden beeinflußt. Im wesentlichen muß daher nur die unspezifische Bindung der als Referenz dienenden Liganden berücksichtigt werden.

25

Ein wesentlicher Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß auch bei Liganden, welche schwierig direkt zu quantifizieren sind, beim Schritt lit. d nur die Menge der als Referenz dienenden ungebundenen Liganden ermittelt werden muß. Das Verfahren unterliegt somit keinen Beschränkungen, die in der Natur der nicht als Referenz dienenden Liganden liegen und Probleme bei der Quantifizierung bereiten. Da die Liganden in nativer Form vorliegen ist es möglich, Ergebnisse zu erhalten.

ten, die nicht durch ein die Bindungseigenschaften beeinflus-
sendes Markieren der Liganden verfälscht sind. Ein durch die
Handhabung von Markierungssubstanzen erforderlicher Aufwand
entfällt. Dieser kann insbesondere bei radioaktiven Markie-
5 rierungssubstanzen sehr hoch sein. Auch eine mit der Verwendung
radioaktiver Markierungssubstanzen verbundene gesundheitliche
Gefährdung findet nicht statt.

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht in der Vermeidung
10 des oben genannten systemimmanenten Fehlers durch das Abson-
dern unter den Bedingungen gemäß lit. c. Die Menge von an
Ziel-Molekülen gebunden Liganden ist exakt bestimmbar. Das
erfindungsgemäße Verfahren erfordert einen geringen Aufwand.
Es ist lediglich das Absondern gebundener Liganden erforder-
15 lich. Die Isolation gebildeter Liganden-Ziel-Molekül-Komplexe
entfällt. Ein Waschschritt ist beim erfindungsgemäßen Verfah-
ren nicht erforderlich. Durch die geringere Zahl der Arbeits-
schritte verringert sich gegenüber dem Stand der Technik das
Risiko, Fehler einzuschleppen. Die beim Schritt lit. a be-
20 reitgestellte Mischphase kann die Liganden in einer Mischung
mit verschiedenen anderen Substanzen enthalten. Das erfin-
dungsgemäße Verfahren ist geeignet, schnell und einfach an
die Ziel-Moleküle gebundene Liganden aus der Mischung zu
identifizieren.

25

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung weisen die als Referenz
dienenden Liganden mindestens eine bekannte Affinität zu den
Ziel-Molekülen auf. Sie können als Referenz zur Bestimmung
einer unbekannten Affinität dienen. Dabei kann die Bestimmung
30 auch in einer bloßen Abschätzung bestehen. Vorzugsweise sind
die als Referenz dienenden Liganden voneinander verschieden
und weisen abgestufte Affinitäten zu den Ziel-Molekülen auf.
Weitere in der Mischphase enthaltene Liganden mit unbekannter

Affinität bewirken dann eine abgestufte Inhibition der Bindung der als Referenz dienenden Liganden. Aus der Menge der jeweils gebundenen als Referenz dienenden Liganden kann schnell und einfach die unbekannte Affinität der weiteren Liganden bestimmt oder zumindest abgeschätzt oder eingegrenzt werden.

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung werden zur Bestimmung der Affinität der Liganden zu den Ziel-Molekülen die Schritte lit. a bis lit. e mit Liganden und Ziel-Molekülen in einem ersten Mengen-Verhältnis durchgeführt und dann mit Liganden und Ziel-Molekülen in mindestens einem weiteren Mengenverhältnis wiederholt. Vorteilhafterweise erfolgt dabei das Inkubieren bis zum Erreichen des Bindungsgleichgewichts. Aus den Mengen der bei den unterschiedlichen Mengen-Verhältnissen gebundenen Liganden kann, beispielsweise mittels einer nicht linearen Regressionsanalyse der Sättigungsisonotherme, die Affinität ermittelt werden. Die Sättigungsisonotherme stellt die Menge der an die Ziel-Moleküle gebundenen Liganden in Abhängigkeit von der Konzentration ungebundener Liganden dar.

Besonders vorteilhaft ist es, wenn beim erfindungsgemäßen Verfahren die Ziel-Moleküle in nativer, insbesondere in nicht immobilisierter, Form bereitgestellt werden. Dadurch ist es möglich, Ergebnisse zu erhalten, die nicht durch die Bindungseigenschaften beeinflussendes Immobilisieren verfälscht sind. Es ist auch möglich, die Liganden in der Mischphase nach Durchführung des Schritts lit. c, insbesondere mittels eines Fluorophors, zu markieren. Dabei werden ungebundene Liganden markiert, nachdem eine Bindung von Liganden an die Ziel-Moleküle stattgefunden hat. Das Ergebnis kann nicht dadurch verfälscht werden, daß das Markieren eine Veränderung der Bindungseigenschaften der Liganden bewirkt. Die Markie-

rung ermöglicht das Ermitteln der Menge ungebundener Liganden mittels empfindlicher Nachweismethoden. Die Empfindlichkeit des Verfahrens kann durch diese Maßnahme gesteigert werden.

5 Weiterhin ist es vorteilhaft, wenn die Mischphase gemäß Schritt lit. a mehr als 10, insbesondere mehr als 100, verschiedene Liganden enthält.

10 Nach Durchführung des Schritts lit. c und vor Durchführung des Schritts lit. d kann ein Trennschritt, insbesondere unter Verwendung von Gaschromatographie, Kapillarelektrophorese, Flüssigkeitschromatographie, vorzugsweise HPLC, FPLC®, Umkehrphasenchromatographie oder Affinitätschromatographie, erfolgen. Der Trennschritt kann beispielsweise einer Massenspektrometrie direkt vorgeschaltet sein. Das ermöglicht das Differenzieren zwischen Liganden, die bei sich direkt an den Schritt lit. c anschließender Durchführung des Schritts lit. d nicht unterscheidbar sind. Beispielsweise kann zwischen Isomeren unterschieden werden. Nach Durchführung des Schritts 15 lit. c und vor Durchführung des Schritts lit. d können die Liganden in der Mischphase konzentriert werden. Das erhöht die Empfindlichkeit des Verfahrens und ermöglicht den Einsatz von weiteren, weniger sensitiven Nachweismethoden.

20 25 Bevorzugt sind die Liganden derart zusammengestellt, daß zumindest die Menge der als Referenz dienenden, vorzugsweise die Menge aller, Liganden bei Durchführung des Schritts lit. d in einem Arbeitsgang ermittelt werden kann. Ein vorhergehender Trennschritt ist dabei nicht erforderlich. Beispielsweise werden Liganden unterschiedlicher Molmasse zusammenge stellt, wenn die Detektion massenspektrometrisch erfolgen soll. So ist es möglich, die Affinitäten oder gebundenen Mengen einer großen Zahl von Liganden gleichzeitig zu ermitteln.

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung werden beim Schritt lit. a verschiedene Ziel-Moleküle bereitgestellt. Dadurch ist es möglich, die Menge von an verschiedenen Ziel-Molekülen gebundenen Liganden gleichzeitig zu bestimmen. Auch die Affinitäten 5 der Liganden zu verschiedenen Ziel-Molekülen können gleichzeitig bestimmt werden. Vorzugsweise liegen die Ziel-Moleküle in einer Konzentration größer als 1 nM, insbesondere größer als 100 nM, vorzugsweise größer als 1 µM, vor. Durch den Einsatz der Ziel-Moleküle in hoher Konzentration kann eine 10 große Menge gebundener Liganden erreicht werden. Das erhöht die Empfindlichkeit des Verfahrens. Vorteilhaft ist der Einsatz der Ziel-Moleküle in hoher Konzentration auch dann, wenn die Mischphase gemäß Schritt lit. a verschiedene Liganden mit unterschiedlichen Affinitäten zu den Ziel-Molekülen 15 enthält. Große Mengen gebundener Liganden bewirken auch große Unterschiede zwischen den Mengen der verschiedenen gebundenen Liganden. Dadurch kann besser zwischen diesen Mengen unterschieden werden.

20 Zusätzlich kann die Mischphase Inhibitoren einer Bindung der Liganden an die Ziel-Moleküle enthalten. Bei Ziel-Molekülen mit verschiedenen Bindungsstellen können Inhibitoren eingesetzt werden, die eine Spezifität für eine oder mehrere dieser Bindungsstellen aufweisen. Beim Bereitstellen von verschiedenen 25 Ziel-Molekülen und/oder Ziel-Molekülen mit verschiedenen Bindungsstellen kann ein Bindungsansatz ohne einen Inhibitor mit jeweils einem Bindungsansatz verglichen werden, der einen Inhibitor mit einer Spezifität für ein Ziel-Molekül oder eine Bindungsstelle enthält. So können Bindungen selektiv 30 untersucht werden. Inhibitoren mit bekannter Affinität zu den Ziel-Molekülen können als Referenz zur Bestimmung einer unbekannten Affinität dienen.

Vorteilhafterweise erfolgt das Ermitteln der Menge der Liganden mittels eines Verfahrens, mit dem weniger als 10 ng, insbesondere weniger als 100 pg, vorzugsweise weniger als 100 fg, der Liganden detektierbar sind. Die Menge der Liganden kann mittels Massenspektrometrie, Kapillarelektrophorese oder Gas- oder Flüssigkeitschromatographie, vorzugsweise HPLC oder FPLC[®], insbesondere unter Verwendung von Umkehrphasenchromatographie, ermittelt werden. Die Detektion nach der Gas- oder Flüssigkeitschromatographie oder Kapillarelektrophorese kann mittels Massenspektrometrie, Spektralphotometrie, insbesondere mittels UV-Detektion oder Diodenfeld-Detektion, Fluoreszenzdetektion, Lumineszenzdetektion, elektrochemischer Oxidation oder Reduktion oder Flammenionisationsdetektion erfolgen.

15

Vorzugsweise wird die Menge der Liganden in der Mischphase vor Durchführung des Schritts lit. c, insbesondere vor Durchführung des Schritts lit. b, mit einem Messverfahren gemessen, welches bei Durchführung des Schritts lit. d zum Ermitteln der Menge der Liganden eingesetzt wird. Das ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit der eingesetzten mit der beim Schritt lit. d ermittelten Menge der Liganden. Ferner kann dadurch das Messverfahren für das Ermitteln der Menge der Liganden geeicht werden.

25

Bei einem Ausführungsbeispiel liegen die Ziel-Moleküle gelöst oder suspendiert vor. Die Bindungseigenschaften der Ziel-Moleküle sind nicht durch Immobilisieren verändert. Die Ziel-Moleküle können in Membranstrukturen eingebettet vorliegen. Die Membranstrukturen können nativ oder künstlich sein. Die Ziel-Moleküle sind dabei nicht immobilisiert. Sie können

durch einfache Verfahren, wie Zentrifugation, abgesondert werden.

Das Absondern gemäß lit. c kann durch Dialyse, Präzipitation, 5 Adsorption, Bindung an immobilisierte Moleküle mit einer Affinität zu gebildeten Ligand-Ziel-Molekül-Komplexen, Zentrifugation oder Filtration, insbesondere Ultrafiltration, erfolgen. Die Moleküle mit einer Affinität zu gebildeten Ligand-Ziel-Molekül-Komplexen können an, insbesondere magnetisch, abzusondernden Partikeln immobilisiert sein. Vorteilhafterweise werden die Ziel-Moleküle nach Durchführung des Schritts lit. c regeneriert. Dies ermöglicht deren Wiederverwendung. Das ist besonders bei kostbaren Ziel-Molekülen sinnvoll, z.B. bei Ziel-Molekülen auf Zellen, an denen mehrere 10 Untersuchungen durchgeführt werden sollen.

Die Ziel-Moleküle oder Liganden können aus folgender Gruppe ausgewählt sein: Peptide, Proteine, insbesondere Rezeptoren, niedermolekulare Verbindungen, Prionen, Enzyme, Transportproteine, Ionenkanäle oder Antikörper, Hormone, Nukleinsäuren, Zucker, Polymere und Strukturen auf oder in Zellen, Zellfragmente, Zellhomogenaten, Synaptosomen, Liposomen, synaptischen Plasmamembran-Vesikeln, Gewebeschnitten, Viren, deren Bestandteilen oder Fragmenten dieser Bestandteile, Kapsiden, 20 deren Bestandteilen oder Fragmenten dieser Bestandteile und Naturstoffgemischen.

Die Erfindung betrifft darüber hinaus eine Kombination von Liganden zur Verwendung in einem erfindungsgemäßen Verfahren, 30 wobei die Liganden derart zusammengestellt sind, daß zumindest die Menge von als Referenz dienenden Liganden bei Durchführung des Schritts lit. d in einem Arbeitsgang ermittelt werden kann. Vorzugsweise sind die Liganden dabei so zusam-

mengestellt, daß die Menge aller Liganden bei Durchführung des Schritts lit. d in einem Arbeitsgang ermittelt werden kann. Weiterhin betrifft die Erfindung eine Kombination von Liganden zur Verwendung in einem erfindungsgemäßen Verfahren,
5 wobei als Referenz dienende Liganden voneinander verschieden sind und abgestufte Affinitäten zu den Ziel-Molekülen aufweisen.

Nachfolgend wird die Erfindung durch die Zeichnung und anhand
10 von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1a, 1b, 1c eine schematische Darstellung eines Bindungsansatzes mit den Liganden LA, LB und LC sowie den Ziel-Molekülen TA,
15

Fig. 2a, 2b, 2c eine schematische Darstellung eines Bindungsansatzes mit den Liganden LA, LB und LC, den Ziel-Molekülen TA und TC und

20 Fig. 3a, 3b, 3c eine schematische Darstellung eines Bindungsansatzes mit den Liganden LA, LB und LC, den Ziel-Molekülen TA und TC sowie den Inhibitoren IA.

25 Ausführungsbeispiel 1:

Fig. 1a zeigt schematisch einen Bindungsansatz mit den Liganden LA, LB und LC sowie einer einzigen Sorte von Ziel-Molekülen TA. Dabei weist LA zu TA eine hohe, LB zu TA eine geringe und LC zu TA eine sehr geringe Affinität auf. Im Anschluß an die in Fig. 1b dargestellte Inkubation erfolgt das Absondern gebundener Liganden von der Mischphase. Das kann durch Zentrifugation erfolgen. Fig. 1c zeigt die Situation nach dem Absondern. Die Menge von LC in der Mischphase ist

unverändert geblieben. Die Mengen von LA und LB in der Mischphase haben sich um die an TA gebundenen Mengen verringert.

Für einen schematisch in den Figuren 1a bis 1c dargestellten Bindungsansatz wird eine Membranpräparation transfizierter CHO-K1 Zellen, die als Ziel-Moleküle humane μ -opioid Rezeptoren exprimieren (Biotrend GmbH, Köln, Deutschland), verwendet. Die in einer Konzentration von 50 nM bzw. einer Menge von 12,5 pmol vorliegenden μ -opioid Rezeptoren werden mit 100 nM, entsprechend 25 pmol Morphin, 100 nM, entsprechend 25 pmol Codein, und 100 nM, entsprechend 25 pmol Tramadol als Liganden sowie 5 mM MgCl₂ und 50 mM Tris HCl, pH 7,4 in einem Gesamtvolumen von 250 μ l 150 Minuten bei 25° C in einem 1,5 ml PP-Reaktionsgefäß inkubiert. Anschließend werden die Membranpartikel bei 50000 x g 20 Minuten bei 4° C abzentrifugiert. Vom Überstand Ü1 werden 150 μ l abgenommen.

In Ü1 werden Morphin, Codein und Tramadol mittels HPLC getrennt. Dabei wird eine LiChrospher 60 RP select B-Trennsäule verwendet. Als Laufmittel A wird 0,1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Methanol verwendet. Zur Chromatographie wird ein Gradient eingesetzt, bei dem sich die Konzentrationen der Laufmittel von 100 % A und 0 % B zu 0 % A und 100 % B bei einer Flussrate von 0,8 ml pro Minute ändern. Anschließend erfolgt eine massenspektrometrische Quantifizierung im MS/MS-Modus mittels eines Finnigan LCQ Deca-Massenspektrometers. Dieses Massenspektrometer ist ein Ion-Trap-Massenspektrometer, das ein API-Interface mit Elektro-Spray-Ionisation nutzt.

30

Ebenso wird ein Überstand Ü1* hergestellt, der sich vom Überstand Ü1 dadurch unterscheidet, daß er aus einer Membranpräparation ohne Zusatz von Liganden gewonnen wird. Es wird eine

Lösung L1 hergestellt, die Morphin, Codein und Tramadol jeweils in einer Konzentration von 100 nM in Ü1* enthält. Die Lösung L1 wird ebenso analysiert, wie für Ü1 beschrieben. Mit den aus L1 ermittelten Ansprechfaktoren für die Liganden sind 5 die folgenden Mengen der jeweiligen Liganden berechnet worden, die insgesamt in ungebundener Form in Ü1 vorhanden sind:

Morphin 13,2 pmol,
Codein 24,1 pmol und
10 Tramadol 24,3 pmol.

Aus der jeweiligen Differenz der eingesetzten und in L1 bestimmten Menge an Ligand und der für Ü1 ermittelten Menge an nicht gebundenem Ligand sind die folgenden Mengen gebundener 15 Liganden ermittelt worden:

Morphin 11,8 pmol,
Codein 0,9 pmol und
Tramadol 0,7 pmol.
20

Je größer der Anteil des an Ziel-Moleküle gebundenen Liganden ist, desto größer ist die Affinität des Liganden zum Ziel-Molekül. Für die relativen Affinitäten der untersuchten Liganden zu den Ziel-Molekülen ergibt sich somit, daß Morphin 25 eine deutlich höhere Affinität zu den Ziel-Molekülen aufweist als Codein und Tramadol. Gegebenenfalls läßt sich der K_d -Wert als Maß für die Affinität eines Liganden zum Ziel-Molekül für die zu untersuchenden Liganden, wie hier z.B. Morphin, mit Hilfe mindestens einer dem Bindungsansatz zugesetzten Referenz 30 mit bekannter Affinität zu den Ziel-Molekülen aus den gewonnenen Daten gut abschätzen.

Wenn nur eine Art von Ziel-Molekülen vorliegt, die Liganden in einem geeigneten Konzentrationsbereich vorliegen und ein Binden der Liganden an andere Bindungsstellen als die Zielmoleküle weitgehend ausgeschlossen werden kann, lässt sich der
5 K_d -Wert als Maß für die Affinität eines Liganden LA zu einem Ziel-Molekül TA wie folgt berechnen:

$$K_d = [TA\text{-frei}] \times [LA\text{-frei}] / [LA\text{-gebunden}]$$

10 Dabei ist

- $[TA\text{-frei}]$ die Konzentration der freien Ziel-Moleküle TA,
- $[LA\text{-frei}]$ die Konzentration der freien Liganden LA und
- $[LA\text{-gebunden}]$ die Konzentration der an die Ziel-Moleküle TA spezifisch gebundenen Liganden LA

15 im Bindungsansatz nach der Inkubation.

20

Ausführungsbeispiel 2:

Zur exakten Ermittlung der Affinität von Liganden zu Ziel-Molekülen sind Daten aus mindestens zwei Bindungsansätzen erforderlich. In den Bindungsansätzen müssen die Liganden und
25 die Ziel-Moleküle in unterschiedlichen Mengen-Verhältnissen vorliegen. Aus den Mengen der bei den unterschiedlichen Mengen-Verhältnissen gebundenen Liganden kann die Affinität ermittelt werden.

30 In den Bindungsansätzen B1 bis B6 werden humane μ -opioid Rezeptoren als Ziel-Moleküle in einer Konzentration von 50 nM, die einer Menge von 12,5 pmol entspricht, mit jeweils einer Konzentration Codein in Gegenwart von 5 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris

HCl pH 7,4 in einem Gesamtvolumen von 250 µl 150 Minuten bei 25° C in einem 1,5 ml PP-Reaktionsgefäß inkubiert. Die Bindungsansätze weisen dabei die folgenden Codein-Konzentrationen und -Mengen auf: B1 - 20 nM - 5 pmol, B2 - 60 nM - 15 pmol, B3 - 200 nM - 50 pmol, B4 - 600 nM - 150 pmol, B5 - 2 µM - 500 pmol und B6 - 20 µM - 5000 pmol. Anschließend werden die Membranpartikel bei 50000 x g 20 Minuten bei 4° C abzentrifugiert. Von den Überständen Ü1 bis Ü6 der Bindungsansätze B1 bis B6 werden jeweils 150 µl abgenommen und wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben mittels HPLC und anschließender Massenspektrometrie quantifiziert.

Wie im Ausführungsbeispiel 1 beschrieben, wird ein Überstand Ü1* erzeugt. Es werden Lösungen L1 bis L6 hergestellt, in denen Codein in Ü1* in den folgenden Konzentration und Mengen vorliegt: L1 - 20 nM - 5 pmol, L2 - 60 nM - 15 pmol, L3 - 200 nM - 50 pmol, L4 - 600 nM - 150 pmol, L5 - 2 µM - 500 pmol und L6 - 20 µM - 5000 pmol. Die Lösungen L1 bis L6 werden analysiert wie es für Ü1 bis Ü6 beschrieben worden ist.

Mit dem aus L1 bis L6 ermittelten Ansprechfaktor für den Liganden sind die folgenden Mengen der insgesamt in ungebundener Form in Ü1 bis Ü6 vorliegenden Liganden berechnet worden:

Ü1 4,0 pmol,
Ü2 10,9 pmol,
Ü3 41,7 pmol,
Ü4 134,5 pmol,
Ü5 463,1 pmol und
Ü6 4737 pmol.

Aus der jeweiligen Differenz der in L1 bis L6 eingesetzten Menge an Ligand und der in Ü1 bis Ü6 ermittelten Menge an

nicht gebundenem Ligand sind für B1 bis B6 die folgenden Mengen insgesamt gebundener Liganden ermittelt worden:

B1 1,0 pmol,
5 B2 4,1 pmol,
B3 8,3 pmol,
B4 15,5 pmol,
B5 36,9 pmol und
B6 263 pmol.

10

Falls in dem Bindungsansatz zusätzlich zu den Ziel-Molekülen auch noch andere Bindungsstellen enthalten sind, an welche der Ligand unspezifisch bindet, muß dies für eine exakte Ermittlung der Affinität berücksichtigt werden. Durch Wahl geeigneter Konzentrationsverhältnisse in einem Sättigungsversuch, wie in diesem Ausführungsbeispiel beschrieben, können die jeweiligen Mengen des unspezifisch gebundenen Liganden aus der in B1 bis B6 ermittelten Gesamtbinding durch nicht lineare Regressionsanalyse mittels des Programms Prism 2.01 der Firma GraphPad, Software, Inc., San Diego berechnet werden. Im vorliegenden Ausführungsbeispiel sind die folgenden Mengen unspezifisch gebundener Liganden ermittelt worden:

B1 0,25 pmol,
25 B2 0,75 pmol,
B3 2,5 pmol,
B4 7,5 pmol,
B5 25 pmol und
B6 250 pmol.

30

Wird die für B1 bis B6 berechnete Menge unspezifischer Bindung jeweils von der Menge des insgesamt gebundenen Liganden

subtrahiert, wird die folgende spezifische, d.h. ausschließlich an Ziel-Moleküle erfolgte, Bindung erhalten:

- B1 0,75 pmol,
5 B2 3,3 pmol,
B3 5,8 pmol,
B4 8,0 pmol,
B5 11,9 pmol und
B6 13,0 pmol.

10

Es ist bis zum Erreichen eines Bindungsgleichgewichts inkubiert worden. Zur Berechnung der Affinität eines Liganden zu den Ziel-Molekülen ist es erforderlich, für B1 bis B6 die Konzentrationen des nicht gebundenen, d.h. freien Liganden, 15 und der gebildeten Liganden-Ziel-Molekül-Komplexe zu kennen. Die Konzentration der Ziel-Moleküle insgesamt sowie die Konzentration der nicht gebundenen, d.h. freien Ziel-Moleküle, ist bekannt.

20 Aus der entsprechenden Sättigungsisotherme für B1 bis B6 lässt sich durch nicht lineare Regressionsanalyse mittels des Programms Prism 2.01 der Firma GraphPad, Software, Inc., San Diego der K_d -Wert berechnen.

25 Aus den in B1 bis B6 erhaltenen Daten ergibt sich für Codein ein K_d -Wert von $2,2 \times 10^{-7}$ mol/l bei einer Gesamtkonzentration der Ziel-Moleküle von $5,2 \times 10^{-8}$ mol/l.

Gegebenenfalls kann zur Bestimmung der nicht spezifischen 30 Bindung auch die Durchführung eines weiteren Bindungsansatzes in Gegenwart eines spezifischen Liganden, welche eine Bindung an die Ziel-Moleküle selektiv unterdrückt, erforderlich sein. Es wird auf Ausführungsbeispiel 3 verwiesen.

35

Analog können auch die K_d -Werte für mehrere Liganden gleichzeitig bestimmt werden. Dafür können die einzelnen Liganden nebeneinander in jeweils gleicher Konzentration in einem Bindungsansatz eingesetzt werden.

5

Ausführungsbeispiel 3:

Fig. 2a zeigt schematisch einen Bindungsansatz mit den Liganden LA, LB und LC sowie den Ziel-Molekülen TA und TC. Dabei weist LA zu TA und LC zu TC eine Affinität auf. LB besitzt 10 keine Affinität zu den im Ansatz vorhandenen Ziel-Molekülen. Im Anschluß an die in Fig. 2b dargestellte Inkubation erfolgt das Absondern gebundener Liganden von der Mischphase. Das kann durch Zentrifugation geschehen. Fig. 2c zeigt die Situation nach dem Absondern. Die Menge von LB in der Mischphase 15 ist unverändert geblieben. Die Mengen von LA und LC in der Mischphase haben sich um die an TA und TC gebundenen Mengen verringert. Es sollen Liganden identifiziert werden, die Affinität zu TA, nicht aber zu TC besitzen. Dazu wird zu einem zweiten Bindungsansatz, wie er in Fig. 3a dargestellt ist, 20 ein spezifischer Inhibitor IA im Überschuß gegenüber TA zugesetzt. Fig. 3a zeigt den Bindungsansatz schematisch. Der Inhibitor bindet spezifisch an TA und verhindert die Bindung von LA an TA. In Fig. 3b ist der Zustand am Ende der Inkubation dargestellt. Fig. 3c zeigt die Situation nach dem Absondern 25 gebundener Liganden einschließlich des gebundenen Inhibitors IA. Es befinden sich unveränderte Mengen von LB und LA in der Mischphase. Die Menge an LC in der Mischphase hat sich verringert. Aus dem Vergleich der Zusammensetzungen der in Fig. 2c und der in Fig. 3c dargestellten Mischphasen ergibt 30 sich, welche Liganden eine Affinität zu dem Ziel-Molekül TA aufweisen.

In dem schematisch in den Figuren 2a bis 2c dargestellten Bindungsansatz wird eine Präparation synaptischer Plasmamembran-Vesikel (spm-Vesikel) verwendet. Die spm-Vesikel sind aus dem Hippocampus von Schweinen gewonnen (G. Höfner und K. Th. Wanner, Eur. J. Pharmacol. 394, 211-219, 2000) und anschließend 4 x in 5 mM Tris-HCl pH 7,4 gewaschen worden (G. Höfner und K. Th. Wanner, J. Recept. Signal Transduct. Res. 16, 297-313, 1996). Neben vielen anderen Ziel-Molekülen enthält diese spm-Vesikel-Präparation N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren, die neben anderen Bindungsstellen Bindungsstellen für Glycin enthalten. In einem ersten Bindungsansatz B1 werden die spm-Vesikel in einer Proteinkonzentration von 15 mg/ml, entsprechend einer Konzentration bzw. Menge der Glycinsbindungsstellen von 50 nM bzw. 12,5 pmol, mit 100 nM, entsprechend 25 pmol Aminocyclopropancarbonsäure, 100 nM, entsprechend 25 pmol L-Methionin und 100 nM, entsprechend 25 pmol L-Phenylalanin sowie 10 mM MgCl₂ und 5 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,4 in einem Gesamtvolume von 250 µl 180 Minuten bei 4° C in einem 1,5 ml PP-Reaktionsgefäß inkubiert. Anschließend werden die spm-Vesikel bei 50000 x g 20 Minuten bei 4° C abzentrifugiert. Vom Überstand Ü1 werden 100 µl abgenommen.

In Ü1 werden Aminocyclopropancarbonsäure, L-Methionin und L-Phenylalanin mittels HPLC, wie in ChromCircle Version 1.3, 1997, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland beschrieben, getrennt. Dazu sind die folgenden Laufmittel verwendet worden: Laufmittel A: Wasser, Laufmittel B: Acetonitril und Laufmittel C: Ammoniumformiatpuffer pH 4,4. Zur Chromatographie wird ein Gradient eingesetzt, bei dem sich die Konzentrationen der Laufmittel von 100 % A, 0 % B und 0 % C zu 0 % A, 50 % B und 50 % C bei einer Flussrate von 0,8 ml pro Minute ändern. Die Quantifizierung erfolgt wie im Ausführungsbeispiel 1 be-

schrieben mittels eines Finnigan LCQ Deca-Massenspektrometers im MS/MS-Modus.

Parallel dazu wird eine zweite Bindung in einem Bindungsansatz B2 durchgeführt. B2 unterscheidet sich vom ersten Bindungsansatz B1 nur dadurch, daß zusätzlich 10 µM MDL 105,515, ein selektiver Ligand für eine Glycinbindungsstelle am NMDA Rezeptor, enthalten sind. Aus B2 wird ein Überstand Ü2 gewonnen, der wie Ü1 analysiert wird.

10

Ebenso wird ein Überstand Ü1* hergestellt, der sich vom Überstand Ü1 dadurch unterscheidet, daß er aus einer spm-Vesikel-Päparation ohne Zusatz von Liganden gewonnen wird. Es wird eine Lösung L1 hergestellt, die 100 nM Aminocyclopropancarbonsäure, 100 nM L-Methionin und 100 nM L-Phenylalanin in Ü1* enthält. Diese Lösung L1 wird ebenso analysiert wie Ü1. Es ergeben sich die folgenden Mengen ungebundener Liganden:

Ü1:

20

Aminocyclopropancarbonsäure	17,5 pmol
L-Methionin	22,3 pmol
L-Phenylalanin	22,2 pmol

25 Ü2:

Aminocyclopropancarbonsäure	22,0 pmol
L-Methionin	22,3 pmol
L-Phenylalanin	22,1 pmol

30

Aus der Differenz der jeweils eingesetzten und in L1 bestimmten Menge an Liganden und der für Ü1 bzw. Ü2 jeweils ermit-

telten Menge nicht gebundener Liganden, sind die folgenden Mengen gebundener Liganden ermittelt worden:

Ü1:

5	Aminocyclopropancarbonsäure	7,5 pmol
	L-Methionin	2,7 pmol
	L-Phenylalanin	2,8 pmol

Ü2:

- 10
- | | |
|-----------------------------|----------|
| Aminocyclopropancarbonsäure | 3,0 pmol |
| L-Methionin | 2,7 pmol |
| L-Phenylalanin | 2,9 pmol |
- 15 Aus der Differenz der jeweiligen Menge an Liganden in Ü1 und Ü2 wird die Menge spezifisch an Ziel-Moleküle gebundener Liganden in B1 wie folgt berechnet:

20	Aminocyclopropancarbonsäure	4,5 pmol
	L-Methionin	0 pmol
	L-Phenylalanin	~0 pmol

Je größer der Anteil der an Ziel-Moleküle gebundenen Liganden ist, desto größer ist die Affinität des Liganden zum Ziel-Molekül. Für die relativen Affinitäten der drei untersuchten Liganden zu den Ziel-Molekülen ergibt sich somit, daß Aminocyclopropancarbonsäure eine deutlich höhere Affinität zum Ziel-Molekül besitzt als L-Methionin und L-Phenylalanin. Die Affinitäten von L-Methionin und L-Phenylalanin sind unter diesen Bedingungen nicht messbar. Gegebenenfalls lässt sich der K_d -Wert als Maß für die Affinität eines Liganden, in diesem Ausführungsbeispiel von Aminocyclopropancarbonsäure, zum

Ziel-Molekül für die zu untersuchenden Liganden mit Hilfe mindestens einer dem Bindungsansatz zugesetzten Referenz mit bekannter Affinität zu den Ziel-Molekülen aus den gewonnenen Daten gut abschätzen.

5

Der K_d -Wert als Maß für die Affinität eines Liganden, in diesem Anwendungsbeispiel für Aminocyclopropancarbonsäure, zum Ziel-Molekül lässt sich außerdem gemäß der Formel

10 $K_d = [TA\text{-frei}] \times [LA\text{-frei}] / [LA\text{-gebunden}]$

berechnen.

15 Aus den ermittelten Ergebnissen ergibt sich für Aminocyclo-
propancarbonsäure ein K_d -Wert von $1,5 \times 10^{-7}$ mol/l.

Ausführungsbeispiel 4:

20 Screening von Substanzbibliotheken in Gegenwart eines als Re-
ferenz dienenden Liganden

4.1. Bindungsansätze

In allen Bindungsansätzen dienten humane μ -opioid Rezeptoren als Ziel-Moleküle. Die Ziel-Moleküle wurden mittels einer
25 Membranpräparation transfizierter humane μ -opioid Rezeptoren exprimierender CHO-K1 Zellen der Fa. NEN, Brüssel, Belgien bereitgestellt.

Ein Ansatz B0 enthielt 8,0 nM μ -opioid Rezeptoren, 5 mM
30 $MgCl_2$, 7,5 % Sucrose und 50 mM Tris HCl, pH 7,4 in einem Gesamtvolumen von 400 μ l. Der Ansatz B0 wurde 150 Minuten bei 25 °C in einem 1,5 ml PP-Reaktionsgefäß inkubiert. Anschließend wurden die Membranpartikel bei 50000 $\times g$ 20 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Vom resultierenden Überstand Ü0 wurden

350 µl abgenommen. Folgende Bindungsansätze wurden wie B0 behandelt:

- 5 - Ein wie B0 zusammengesetzter Bindungsansatz B1, der zusätzlich 10 nM Nalbuphin als Referenz dienende Liganden und als weitere Liganden 10 nM Naloxon und 10 nM Dihydrocodein enthielt. Aus B1 wurde der Überstand Ü1 gewonnen.
- 10 - Ein wie B1 zusammengesetzter Bindungsansatz B2, der zusätzlich (±)-Methadon in einer Konzentration von 50 µM enthielt. Aus B2 wurde der Überstand Ü2 gewonnen.
- 15 - Ein wie B0 zusammengesetzter Bindungsansatz B3, der zusätzlich 10 nM Nalbuphin als Referenz dienende Liganden und als weitere Liganden 10 nM Dihydrocodein und 10 nM (+)-Normetazocin enthielt. Aus B3 wurde der Überstand Ü3 gewonnen.
- 20 - Ein wie B0 zusammengesetzter Bindungsansatz B4, der zusätzlich 10 nM Nalbuphin als Referenz dienende Liganden enthielt. Aus B4 wurde der Überstand Ü4 gewonnen.

4.2. Quantifizierung der Liganden

- 25 Die massenspektrometrische Bestimmung wurde an einem Applied Biosystems API 2000 mit TurboIonSpray-Quelle im MRM-Modus, an das ein Hewlett Packard HP1100 LC-System gekoppelt war, unter folgenden Bedingungen durchgeführt:
- 30 Säule: Superspher 60 RP select B 4 µm 125 x 2 mm
Laufmittel: 0,1 % HCOOH in Wasser / Acetonitril (70/30)
Fluß: 0,4 ml/min (isokratisch)
Probenvolumen: 20 µl (injiziert mittels Autosampler)

Nalbuphin, Naloxon und Dihydrocodein wurden in den Überständen Ü1 bis Ü4 massenspektrometrisch vermessen und mittels einem externen Standard quantifiziert. Als externer Standard wurden jeweils 2 nM, 5 nM, 8 nM und 10 nM Nalbuphin, Naloxon 5 und Dihydrocodein in Ü0 eingesetzt. Alle Proben wurden zweimal vermessen.

4.3. Auswertung

In Ü1 bis Ü4 wurden folgende Konzentrationen der ungebundenen 10 Liganden ermittelt:

	Ü1	Ü2	Ü3	Ü4
Nalbuphin	6,99 nM	9,69 nM	6,32 nM	6,21 nM
Naloxon	5,92 nM	8,66 nM	---*	---*
Dihydrocodein	8,32 nM	8,60 nM	8,43 nM	---*
(+)-Normetazocin	---*	---*	nicht bestimmt	---*

20 *nicht im jeweiligen Bindungsansatz enthalten

Die spezifische Bindung der Liganden in B1 an die Ziel-Moleküle ergibt sich aus der Differenz der in Ü1 bzw. Ü2 ermittelten Konzentrationen. Dihydrocodein zeigt in der eingesetzten Konzentration keine deutlich messbare spezifische Bindung an die Ziel-Moleküle. Naloxon zeigt eine spezifische Bindung in der Größenordnung der Referenz Nalbuphin. Die Referenz erlaubt die Abschätzung, daß Naloxon eine ähnliche Affinität zu den Ziel-Molekülen aufweist wie Nalbuphin.

30 In Ü3 wurden unter den gewählten chromatographischen bzw. massenspektrometrischen Bedingungen nur die Substanzen Nalbuphin und Dihydrocodein, nicht aber (+)-Normetazocin, quantifiziert. Dihydrocodein zeigt in der eingesetzten Konzentrat-

on keine meßbare spezifische Bindung an die Ziel-Moleküle. Der Vergleich von Ü3 mit Ü4 zeigt, daß durch (+)-Normetazocin die Bindung der Referenz Nalbuphin an die Ziel-Moleküle nicht inhibiert wird. Normetazocin zeigt in der eingesetzten Konzentration offensichtlich keine erkennbare spezifische Bindung an die Ziel-Moleküle.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Menge von an Ziel-Molekülen gebundenen Liganden mit folgenden Schritten:

5

a) Bereitstellen der Ziel-Moleküle und einer die Liganden in nativer Form in einer vorgegebenen Menge enthaltenden Mischphase,

10 b) Inkontaktbringen und Inkubieren der Mischphase mit den Ziel-Molekülen,

c) Absondern gebundener Liganden von der Mischphase unter Bedingungen, unter denen die Menge ungebundener Liganden 15 konstant bleibt,

d) Ermitteln der Menge ungebundener Liganden in der Mischphase und

20 e) Ermitteln der Menge gebundener Liganden durch Differenzbildung zwischen der Menge der Liganden gemäß lit. a und der gemäß lit. d ermittelten Menge der Liganden,

25 wobei die Mischphase gemäß Schritt lit. a verschiedene Liganden enthält, die teilweise als Referenz dienen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die als Referenz dienenden Liganden mindestens eine bekannte Affinität zu den Ziel-Molekülen aufweisen.

30

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die als Referenz dienenden Liganden voneinander verschieden sind und abgestufte Affinitäten zu den Ziel-Molekülen aufweisen.
- 5 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Bestimmung der Affinität der Liganden zu den Ziel-Molekülen die Schritte lit. a bis lit. e mit Liganden und Ziel-Molekülen in einem ersten Mengen-Verhältnis durchgeführt und dann mit Liganden und Ziel-Molekülen in mindestens einem weiteren Mengen-Verhältnis wiederholt werden.
10
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Ziel-Moleküle in nativer Form bereitgestellt werden.
- 15 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Liganden in der Mischphase nach Durchführung des Schritts lit. c, insbesondere mittels eines Fluorophors, markiert werden.
- 20 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Mischphase gemäß Schritt lit. a mehr als 10, insbesondere mehr als 100, verschiedene Liganden enthält.
- 25 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach Durchführung des Schritts lit. c und vor Durchführung des Schritts lit. d ein Trennschritt, insbesondere unter Verwendung von Gaschromatographie, Kapillarelektrophorese, Flüssigkeitschromatographie, vorzugsweise HPLC, FPLC®, Umkehrphasenchromatographie oder Affinitätschromatographie, erfolgt.
30
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Liganden in der Mischphase nach Durchführung des Schritts

lit. c und vor Durchführung des Schritts lit. d konzentriert werden.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
5 die Liganden derart zusammengestellt sind, daß zumindest die Menge der als Referenz dienenden, vorzugsweise die Menge aller, Liganden bei Durchführung des Schritts lit. d in einem Arbeitsgang ermittelt werden kann.
- 10 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei beim Schritt lit. a verschiedene Ziel-Moleküle bereitgestellt werden.
- 15 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Ziel-Moleküle in einer Konzentration größer als 1 nM, insbesondere größer als 100 nM, vorzugsweise größer als 1 µM, vorliegen.
- 20 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Mischphase zusätzlich Inhibitoren einer Bindung der Liganden an die Ziel-Moleküle enthält.
- 25 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Ermitteln der Menge der Liganden mittels eines Verfahrens erfolgt, mit dem weniger als 10 ng, insbesondere weniger als 100 pg, vorzugsweise weniger als 100 fg, der Liganden detektierbar sind.
- 30 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Ermitteln der Menge der Liganden mittels Massenspektrometrie, Kapillarelektrophorese oder Gas- oder Flüssigkeitschromatographie, vorzugsweise HPLC oder FPLC®, insbesondere unter Verwendung von Umkehrphasenchromatographie, erfolgt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Detektion nach der Gas- oder Flüssigkeitschromatographie oder Kapillarelektrophorese mittels Massenspektrometrie, Spektralphotometrie, insbesondere mittels UV-Detektion oder Diodenfeld-Detektion,
5 Fluoreszenzdetektion, Lumineszenzdetektion, elektrochemischer Oxidation oder Reduktion oder Flammenionisationsdetektion erfolgt.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
10 die Menge der Liganden in der Mischphase vor Durchführung des Schritts lit. c, insbesondere vor Durchführung des Schritts lit. b, mit einem Messverfahren gemessen wird, welches bei Durchführung des Schritts lit. d zum Ermitteln der Menge der Liganden eingesetzt wird.
15

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Ziel-Moleküle gelöst oder suspendiert vorliegen.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
20 die Ziel-Moleküle in Membranstrukturen eingebettet vorliegen.

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Absondern gemäß lit. c durch Dialyse, Präzipitation, Adsorption, Bindung an immobilisierte Moleküle mit einer Affinität zu gebildeten Ligand-Ziel-Molekül-Komplexen, Zentrifugation oder Filtration, insbesondere Ultrafiltration, erfolgt.
25

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
30 die Ziel-Moleküle nach Durchführung des Schritts lit. c rege-
neriert werden.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Ziel-Moleküle oder Liganden aus folgender Gruppe ausgewählt sind: Peptide, Proteine, insbesondere Rezeptoren, niedermolekulare Verbindungen, Prionen, Enzyme, Transportproteine, Ionenkanäle oder Antikörper, Hormone, Nukleinsäuren, Zucker, Polymere und Strukturen auf oder in Zellen, Zellfragmente, Zellhomogenaten, Synaptosomen, Liposomen, synaptischen Plasmamembran-Vesikeln, Gewebeschnitten, Viren, deren Bestandteilen oder Fragmenten dieser Bestandteile, Kapsiden, deren Bestandteilen oder Fragmenten dieser Bestandteile und Naturstoffgemischen.

23. Kombination von Liganden zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 22, wobei die Liganden derart zusammengestellt sind, daß zumindest die Menge von als Referenz dienenden Liganden bei Durchführung des Schritts lit. d in einem Arbeitsgang ermittelt werden kann.

24. Kombination von Liganden nach Anspruch 23, wobei die Liganden derart zusammengestellt sind, daß die Menge aller Liganden bei Durchführung des Schritts lit. d in einem Arbeitsgang ermittelt werden kann.

25. Kombination von Liganden zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 22, wobei als Referenz dienende Liganden voneinander verschieden sind und abgestufte Affinitäten zu den Ziel-Molekülen aufweisen.

1/3

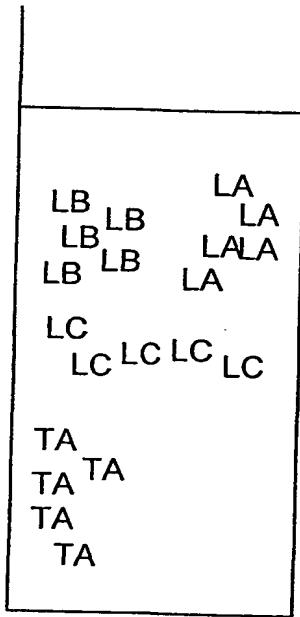


Fig. 1a

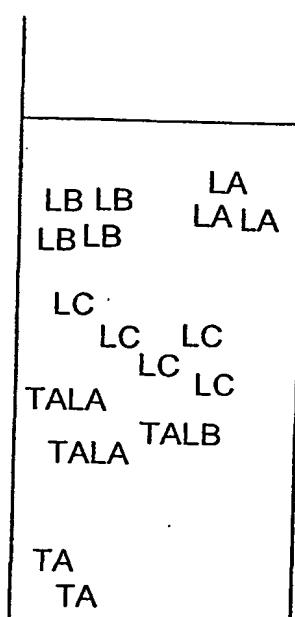


Fig. 1b

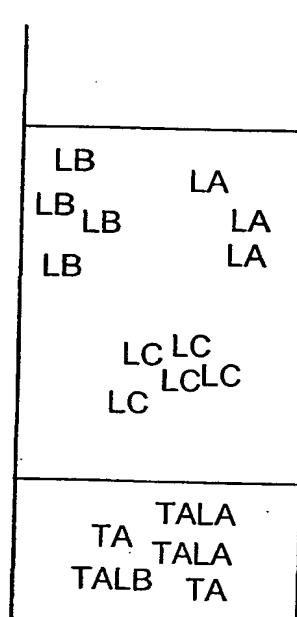


Fig. 1c

2/3

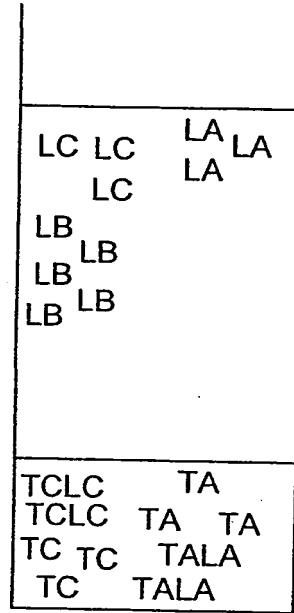
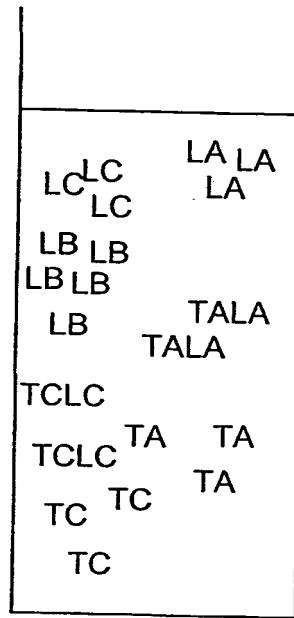
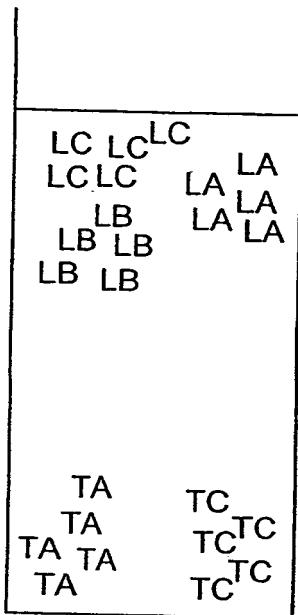


Fig. 2a

Fig. 2b

Fig. 2c

3/3

LC	LC	LC
LC	LC	LA
LB	LA	LA
LB	LB	LA
LB	LB	IA
IA	IA	IA
IA	IA	IA
IA	IA	IA
TA	TC	
TA	TC	TCLC
TA	TC	TCLC
TA	TC	TC

Fig. 3a

LC	LC	LA	LA
LC	LC	LA	LA
LB	LB	LA	
LB	LB	IA	IA
LB	LB	IA	IA
LB	LB	IA	IA
TCLC	TAIA		
TCLC	TAIA	TAIA	
TC	TC	TAIA	
TC		TAIA	

Fig. 3b

LC	LC	LA	LA
LC	LC	LA	LA
LB	LB	IA	IA
LB	LB	IA	IA
LB	LB	IA	IA
TCLC	TAIA		
TCLC	TAIA	TAIA	
TC	TC	TAIA	
TC		TAIA	

Fig. 3c

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Dezember 2001 (13.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/94943 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/537,**
33/94, 33/53, 33/543

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WANNER, Klaus**
[DE/DE]; Kreiller Strasse 122, 81825 München (DE).
HÖFNER, Georg [DE/DE]; Am Olivberg 44, 83607
Holzkirchen (DE). **BERTLING, Wolf** [DE/DE]; Meisen-
weg 22, 91056 Erlangen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02086

(74) Anwalt: **GASSNER, Wolfgang**; Nägelsbachstrasse 49 A,
91052 Erlangen (DE).

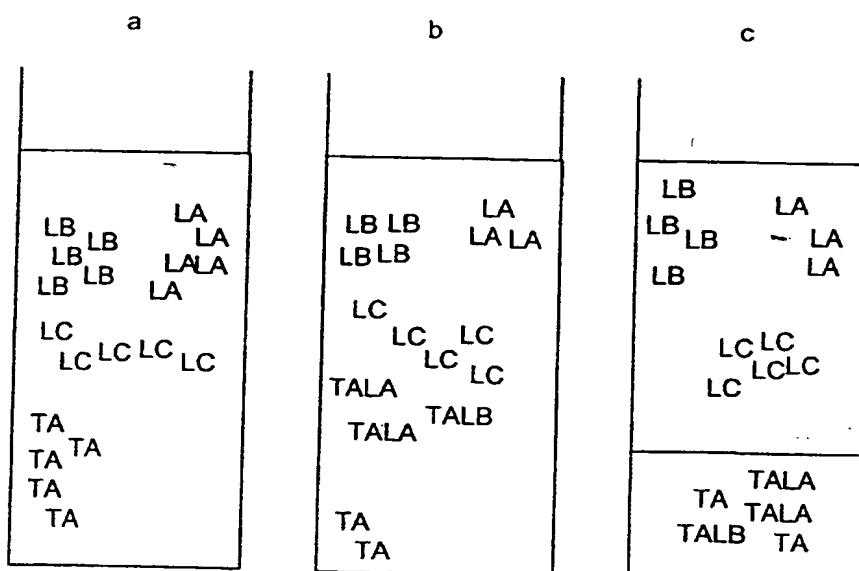
(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Juni 2001 (06.06.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE QUANTITY OF LIGANDS THAT ARE BOUND TO TARGET MOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER MENGE VON AN ZIEL-MOLEKÜLEN GEBUNDENEN LIGAN-
DEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for determining the quantity of ligands that are bound to target molecules. Said method comprises the following steps: a) Preparing the target molecules and a mixed phase containing a predetermined quantity of ligands in native form, b) Bringing the mixed phase into contact with the target molecules and incubating said phase, c) Separating bound ligands from the mixed phase under conditions, in which the quantity of unbound ligands remains constant, d) Determining the quantity of unbound ligands in the mixed phase and e) Determining the quantity of bound ligands, by calculating the difference between the quantity of ligands as per step a) and the quantity of ligands determined as per step d), whereby the mixed phase as per step a) contains different ligands which act in part as a reference.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/94943 A3



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, M, AZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (M, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:**

18. April 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Menge von an Ziel-Molekülen gebundenen Liganden mit folgenden Schritten: a) Bereitstellen der Ziel-Moleküle und einer die Liganden in nativer Form in einer vorgegebenen Menge enthaltenden Mischphase, b) Inkontaktbringen und Inkubieren der Mischphase mit den Ziel-Molekülen, c) Absondern gebundener Liganden von der Mischphase unter Bedingungen, unter denen die Menge ungebundener Liganden konstant bleibt, d) Ermitteln der Menge ungebundener Liganden in der Mischphase und e) Ermitteln der Menge gebundener Liganden durch Differenzbildung zwischen der Menge der Liganden gemäß lit. a und der gemäß lit. d ermittelten Menge der Liganden, wobei die Mischphase gemäß Schritt lit. a verschiedene Liganden enthält, die teilweise als Referenz dienen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/02086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	IPC 7 G01N33/537 G01N33/94 G01N33/53 G01N33/543
-------------------------------------	---

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 198 14 775 A (NIMBUS BIOTECHNOLOGIE GMBH) 14 October 1999 (1999-10-14) cited in the application the whole document ---	1-25
A	US 5 891 742 A (DOLLINGER GAVIN D ET AL) 6 April 1999 (1999-04-06) cited in the application claim 1 ---	1-25
A	WO 83 03306 A (EKINS ROGER PHILIP) 29 September 1983 (1983-09-29) claim 1 ---	1-25
P, A	EP 1 026 504 A (TOYO BOSEKI) 9 August 2000 (2000-08-09) claim 1 -----	1-25

Further documents are listed in the continuation of box C

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* current member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 February 2002

Date of mailing of the international search report

13/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pellegrini, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/02086

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
DE 19814775	A 14-10-1999	DE	19814775 A1	14-10-1999
		AU	3522299 A	25-10-1999
		WO	9951984 A1	14-10-1999
		EP	1066520 A1	10-01-2001
US 5891742	A 06-04-1999	AU	4963796 A	07-08-1996
		CA	2209988 A1	25-07-1996
		EP	0804729 A1	05-11-1997
		JP	10512673 T	02-12-1998
		WO	9622530 A1	25-07-1996
WO 8303306	A 29-09-1983	DE	3382044 D1	17-01-1991
		EP	0103605 A1	28-03-1984
		WO	8303306 A1	29-09-1983
		JP	2599096 B2	09-04-1997
		JP	6313768 A	08-11-1994
		JP	6016046 B	02-03-1994
		JP	59500632 T	12-04-1984
		US	5304498 A	19-04-1994
EP 1026504	A 09-08-2000	JP	2000283984 A	13-10-2000
		EP	1026504 A1	09-08-2000
		US	2001046683 A1	29-11-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02086

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/537 G01N33/94 G01N33/53 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräststoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräststoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 198 14 775 A (NIMBUS BIOTECHNOLOGIE GMBH) 14. Oktober 1999 (1999-10-14) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-25
A	US 5 891 742 A (DOLLINGER GAVIN D ET AL) 6. April 1999 (1999-04-06) in der Anmeldung erwähnt Anspruch 1 ---	1-25
A	WO 83 03306 A (EKINS ROGER PHILIP) 29. September 1983 (1983-09-29) Anspruch 1 ---	1-25
P, A	EP 1 026 504 A (TOYO BOSEKI) 9. August 2000 (2000-08-09) Anspruch 1 -----	1-25

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

8 Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

5. Februar 2002

13/02/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2260 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Pellegrini, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02086

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19814775	A 14-10-1999	DE 19814775 A1		14-10-1999
		AU 3522299 A		25-10-1999
		WO 9951984 A1		14-10-1999
		EP 1066520 A1		10-01-2001
US 5891742	A 06-04-1999	AU 4963796 A		07-08-1996
		CA 2209988 A1		25-07-1996
		EP 0804729 A1		05-11-1997
		JP 10512673 T		02-12-1998
		WO 9622530 A1		25-07-1996
WO 8303306	A 29-09-1983	DE 3382044 D1		17-01-1991
		EP 0103605 A1		28-03-1984
		WO 8303306 A1		29-09-1983
		JP 2599096 B2		09-04-1997
		JP 6313768 A		08-11-1994
		JP 6016046 B		02-03-1994
		JP 59500632 T		12-04-1984
		US 5304498 A		19-04-1994
EP 1026504	A 09-08-2000	JP 2000283984 A		13-10-2000
		EP 1026504 A1		09-08-2000
		US 2001046683 A1		29-11-2001